



特 許

特 許 公 報  
昭和50年9月15日  
第22612号  
第1457号

特許庁長官殿

1. 発明の名称 生物学的水分解による有機酸類の製造法

2. 発明者 山本 隆夫

住 所 フランス国パリ21区

氏 名 ヤヌスト・コノイラ (英名)

3. 特許代理人

住 所 フランス国スイス・ジュネーヴ 92522

氏 名 アドリアン・マドレーヌ・ミウラ

代表者 エム・フエール

住 所 フランス国

4. 発 明 人

住 所 東京都千代田区外神田3-1-1

氏 名 (英名) 山本 隆夫

5. 発明の要旨

(1) 本発明は、生物学的水分解による有機酸類の製造法に関するものである。  
(2) 本発明は、生物学的水分解による有機酸類の製造法に関するものである。  
(3) 本発明は、生物学的水分解による有機酸類の製造法に関するものである。

明 細 書

1. 発明の名称 生物学的水分解による有機酸類の製造法

2. 特許請求の範囲

1) 本発明は、生物学的水分解による有機酸類の製造法に関するものである。  
2) 本発明は、生物学的水分解による有機酸類の製造法に関するものである。

3) 本発明は、生物学的水分解による有機酸類の製造法に関するものである。  
4) 本発明は、生物学的水分解による有機酸類の製造法に関するものである。

5) 本発明は、生物学的水分解による有機酸類の製造法に関するものである。  
6) 本発明は、生物学的水分解による有機酸類の製造法に関するものである。

① 日本特許庁

## 公開特許公報

① 特開昭 50-53586

② 公開日 昭50(1975) 5.12

③ 特願昭 49-108288

④ 出願日 昭49(1974) 9.19

審査請求 未請求 (全6頁)

庁内整理番号

7110 29

⑤ 日本分類

36(2D)24

⑥ Int. Cl.

C12D 1/02

ることを特徴とする、前記1項に係る製造法。

4) 下記の中から選定した菌株を使用すること  
を特徴とする、前記3項に係る製造法。

C211: CDB

R312: CDB717-73

B222: CDB

A111: CDB

R341: CDB

R348: CDB

R332: CDB

5) 中述または前記の菌株で操作することを  
特徴とする、前記1~4項の一つに係る製造法。

6) ニトリルの水溶液中にバクテリアの培養物  
を懸濁させることによりニトリルをバクテリ  
アと反応させることを特徴とする、前記1~  
5項の一つに係る製造法。

7) 工程進行時に少なくとも1回は溶液のpH  
を変化させることを特徴とする、前記1~6項  
の一つに係る製造法。

8) みを一定したpHで操作することを特徴

Best Available Copy

とする、前掲1~6項の一つに係る製法。

9) 反応液の懸液から遠心分離によりバクテリアを分離することを特徴とする、前掲1~8項の一つに係る製法。

10) Yeast carbon base Difco 1.17g、アセトニトリル0.1g、グロース2.5gを含む培地に培がら、選定したバクテリアを使用することを特徴とする、前掲1~8項および9項の一つに係る製法。

#### 本発明の詳細な説明

本発明は、対応するニトリルの生物学的な加水分解による有機酸類の製造法に関する。

たとえば乳酸やアミノ酸類のような、断片的に製造された有機酸類の製造については、対応するニトリルの化学的加水分解により製造することがすでに提案されている。しかし、この方法は、とくに以下の理由から、必ずしも常に適用できない。すなわち、ニトリルのうちには化学的加水分解に応じないものがあり、この場合、この作用を奨励するためには迂回した方法による必要があり、た

より望ましくは、モンペリエの国立農薬高等学校の遺伝学講座のコレクションに保管番号R332、R340、R341、A111、B222、A112、A13、A141、A142、B211、B212、B221、C211、R21、R22、R311、R312、R331で保管されている、第1表および第2表に記載の形態学的、生理学的特徴を示す菌株の中から選ぶ。

ニトリル溶液は、バクテリアと反応させる前に、たとえば苛性ソーダまたはアンモニアにより調節して弱い塩基性のpHにするといふ。

本発明の方法においては、培地で培養後のニトリル活性を有する菌株をニトリル水溶液中に懸浮させ、これらの菌株により数時間で上記溶液の加水分解が実現される。溶液のpHは弱い塩基性（たとえば、pH8）または中性に保持するが、加水分解を完全なものにするためには、約1時間後に溶液のpHを弱い酸性にすることが、しばしば、必要となる。

加水分解が完了すると、すなわち、概して数時間後、生化学的方法で既知のあらゆる手段で、

特開 3586 の

たとえば、α-アミノ酸類の場合、ヒダントインを測ることが考えられるが、この方法は有効であっても、プロセス上懸念がかかる。その他の場合は、化学的加水分解の生成物は、反応培地の他成分からの分離が困難である。

本発明は、これよりよい化合物を製造する場合に、とくに好ましい材料や条件の下で、実用上すべてのニトリル類の加水分解を可能にする方法を提案するものであり、この方法自体が奨励きわめて容易で、かつ、生成された酸の反応培地からの分離を容易に行なうことができる。

本発明の方法においては、対応するニトリルを、水溶液で、ニトリル活性 (activité nitrilase rigide) 示すバクテリアと反応させ、つぎにバクテリアを酸溶液から分離することによつて、上記ニトリルから有機酸が得られる。本発明の方法で用いられるニトリル活性を有するバクテリアは、*Bacillus* 類、Prevot の菌株での *Bacteroides* 類、*Micrococcus* 類、Dorger の菌株での *Brevibacterium* 類の中から選ぶのが好ましい。

たとえば遠心分離で、バクテリアを除去する。一方、酸は既知の方法で、たとえば抽出、沈降2Dにより酸液から抽出する。

本発明の好ましい実施法によれば、土、水または工業廃棄物のような各種の細菌源により、バクテリアに注入した、Yeast carbon base Difco 1.17g、アセトニトリル0.1g、グロース2.5gを含む培地に接種することによつてニトリル活性を有するバクテリアの菌株を選択する。形成されるコロニーを分離し、ついで培養物を希釈し同一培地上に塗布して淨化する。こうして得られたクローンを研究する。

選択した菌株は、たとえばグルコース化した Yeast nitrogen base Difco のような、炭水化物、アンモニア、ビタミン、グルコースを含む培地に保存することができる。

前記のプロセスにより選択した菌株のニトリル活性はきわめて一般的である。すなわち、本明細書に記載した菌株は次のような化合物をほぼ一般に加水分解することができる。

- アセトニトリルのような単純なニトリル類
- ムーアミノプロピオニトリル、ムーアミノノナルアセトニトリル、ムーアミノプロピオニトリル、アミノアセトニトリルのようなムーアミノニトリル類
- ラクトニトリル、ヒドロキシアセトニトリルのようなヒドロキシルニトリル類
- アミノ-3-プロピオニトリルのようなムーアミノニトリル類
- マロニトリルのようなジエトリル類
- アクリロニトリルのような不飽和ニトリル類
- ホモペラトリンニトリルのようなベンゼンニトリル類

前記の毒質プロセスにより、出展人は18の菌株を分離したが、これらの菌株は出展人の方法を要する上でとくに好ましいニトリル活性を有し、つぎの表にしたがって特許を有する。

- グラム陽性、耐アルコール・酸性環境
- 好気性きびしい、カタラーゼ陽性

- 特開 3586 (3)
- ガスを生成せず、かつ酸性化することなく炭化水素によるグルコース、マブコロース、マルトース、ラクトースの発酵可能。どの菌株もアルコールを形成しない。でん粉は加水分解しないが、じやがいもで生長。
- じやがいもによるテロシナーゼ発酵性。
- ビタミン要求あり。
- セラチンの加水分解なし。
- アンモニアおよび唯一の窒素源としての酪素で生長。
- 酸化水素の発生なし。
- 塩分過多な環境の存在下での成長なし。

全菌株が耐塩性による培養基中でアンモニアを産じるほか、B221、B211、B212、C211を例外、両面培養をせざる。B222菌株は両面培養からガスを発生する。

C211、B312、B222、A111、B341、B340、B332が下記番号の下に Central Bureau for Microbiological Culture (オランダ) に保管される。

| 表1 表 |     | 培養上の特徴                                     |                               |
|------|-----|--|-------------------------------|
| 菌株番号 | 運動性 | 菌形・形態                                      | コロニー特徴                        |
| B332 | +   | 小桿状<br>(1.8-3.6) $\mu$<br>$\times 0.9 \mu$ | 丸い、なめらか、凸状、ピンク色、不完全           |
| B340 | +   | 小桿状<br>2.7 $\mu \times 0.9 \mu$            | 丸い、小さい、白色、縁鋭                  |
| B341 | +   | 小桿状<br>2.7 $\mu \times 0.9 \mu$            | 厚い、きわめて粒状、白色、平たい              |
| A111 | -   | 小桿状<br>0.9-1.5 $\mu$                       | 丸い、小さい、凸状、ピンク色、不完全            |
| B222 | -   | 小桿状<br>(3.6-4.5) $\mu$<br>$\times 0.9 \mu$ | 丸い、小さい、オレンジ色、不完全              |
| A112 | -   | 小桿状<br>(1.8-3.6) $\mu$<br>$\times 0.9 \mu$ | 小さい、不透明、厚い、つづいて、不完全、ピンク-オレンジ色 |
| A13  | -   | 小桿状<br>2.2 $\mu \times 0.9 \mu$            | 丸い、なめらか、不透明、オレンジピンク色、不完全      |

|      |   |  |                               |
|------|---|--|-------------------------------|
| A141 | - | 小桿状<br>(1.8-3.6) $\mu$<br>$\times 0.9 \mu$ | 小さい、ほぼ平ら、不透明、粒状、オレンジ-ピンク色、不完全 |
| A142 | - | 小桿状<br>(3.6-4.5) $\mu$<br>$\times 0.9 \mu$ | 丸い、なめらか、不透明、オレンジ色、不完全         |
| B211 | - | 小桿状<br>1.8 $\mu \times 0.9 \mu$            | 丸い、凸状、小さい、なめらか、ピンク色、不完全       |
| B212 | - | 小桿状<br>3.6 $\mu \times 0.9 \mu$            | 丸い、凸状、なめらか、ピンク色、不完全           |
| B221 | - | 小桿状<br>(3.6-4.5) $\mu$<br>$\times 0.9 \mu$ | 丸い、ひじょうに分離、厚い、つづいて、オレンジ-黄色    |
| C211 | - | 小桿状  | 丸い、なめらか、光沢、つづいて、ピンク色、不完全      |
| B21  | - | 小桿状<br>5.4 $\mu \times 0.9 \mu$            | 丸い、平ら、ピンク色、粒状、不完全             |
| B22  | - | 小桿状<br>2.7 $\mu \times 0.9 \mu$            | 丸い、なめらか、オレンジ色、厚い、つづいて、不完全     |

R311 - 粉 小粒状 丸い、黄色、浮上つてい  
(1.8-3.6) $\mu$  む、環元光  
x0.9 $\mu$

R312 - 粉 小粒状 丸い、凸状、黄色、環元  
(4.5-9) $\mu$  全  
x0.9 $\mu$

R331 - 粉 小粒状 丸い、ピンク色、平ら  
4.5x0.9 $\mu$  縁部、不透明

第1表 主たる生理学的特性

| 株    | カタラゼ | インドール | アミン酸 | 卵白の加水分解 | 遊走性 | プロテアーゼ |
|------|------|-------|------|---------|-----|--------|
| R332 | -    | -     | -    | -       | 6.5 | 強      |
| R340 | -    | +     | +    | -       | 6.5 | -      |
| R341 | -    | +     | -    | -       | 6.0 | -      |
| A111 | -    | +     | +    | 経度      | 6.5 | 弱      |
| B222 | +    | -     | +    | -       | 6.0 | -      |
| A112 | -    | +     | +    | -       | 6.5 | -      |
| A13  | -    | +     | -    | -       | 6.0 | 弱      |
| A131 | -    | -     | +    | -       | 6.5 | 弱      |
| A142 | -    | +     | +    | -       | 6.0 | 弱      |
| B311 | -    | +     | +    | -       | 6.5 | 強      |
| B312 | -    | -     | +    | +       | 6.0 | -      |
| B221 | -    | +     | +    | -       | 6.5 | -      |
| C211 | -    | +     | -    | -       | 6.0 | -      |
| R21  | -    | +     | +    | -       | 7-5 | -      |
| R22  | -    | +     | +    | -       | 6.6 | -      |
| R311 | -    | +     | +    | -       | 6.0 | 弱      |
| R312 | -    | -     | +    | 経度      | 6.0 | -      |
| R331 | -    | +     | -    | +       | 6.0 | -      |

C211:CB9

R312:CB2717-73

B222:CB9

A111:CB8

R341:CB2

R340:CB9

R332:CB9

R332菌株は *Bacillus* 属に属するが、たんにく成分分析が弱い。R340、R341菌株は Prevot の意味での *Bacteroides* 属に近い。その他の菌株は新因子である。A111菌株は *Micrococcus* である。その他のすべての菌株は Bergoy の意味での *Brevibacterium* 属に近い。B222 菌株が *Brevibacterium imperiale* にきわめて近いことは注目される。

場合により（たとえば、ホセペクトリニトリル）ニトリルの水溶性が弱いことが問題になるが、本発明の方法で使用するバクテリアのニトリル菌はほとんど問題ない。

本発明の方法の一つの利点は、工場の規模にか

かかわらずバクテリアをリサイクルさせることが可能であり、このためある程度半自動的に作製し、つぎの反応の開始に必要な割合とアンモニアの含有量を減らすことができることである。

以下、本発明の方法の工業的応用例を示し、実施の形態を明らかにするが、本発明は何れによっても限定されない。

すなわち、本発明による菌株は、とくに尿素を含む培養基としてヘキサゲカンまたは「ガス油」を使用（これはガス油の低パラフィン (deparaffinized) を可溶化する）するか、または完全な培養として脱脂乳を使用することにより低コストの培養で培養することができる。

本発明の方法のこれらの実施例はすべて、セントペリコの国立農畜高等学校の遺伝学研究室のコレクションならびに保管番号 CB2717-73 で (Centraal Bureau Voor Schimmelcultures (オランダ) に保管されている R312 菌株を使用して実施したものであり、測定した菌株の特性を証明することをとくに目的としている。これ

は、実施例は全篇 R312 菌株を用いたが、ほとんど全量の遊離乳酸が以下に記述する加水分解を實現することが出来るからである。

#### 実施例 1

##### ラセミ体乳酸の製造

R312 菌株を、炭素源としてグルコースを含む培地で培養した。成長後、細胞を遠心分離し、Physiologic Water で水洗してから、化学的合成で得られたラクチドニトリルの 10 重量百分濃度より調製した反応培地に懸濁させた。可溶性またはアンモニアで pH を調整した。と当たり約 20~40g の乾燥物であるバクテリア細胞がかく抑下 25℃で 2~3 時間でニトリルの完全な加水分解を行なった。ここでバクテリア細胞を遠心分離により除去した。脱脂に浮上つたものは、乾燥により重量的収率で回収可能な乳酸アンモニウムを含む。この生成物はここまですり利用可能である。それから、その用途は多く、たとえば、肥料における石灰質剤として利用できる。また、既知のあらゆる方法で乳酸を回収することも可能であり、たと

うしてから、グリシノニトリル（塩化水素の形）の 6% 水溶液で調製した反応培地に懸濁させた。培養の pH は可溶性またはアンモニアで付添に調整した。

と当たり 60~80g の乾燥物であるバクテリア細胞が 25℃で約 5 時間で pH を約 1 時間で、pH を 7 に近づける 4 時間ニトリルを完全に酸化する。

ここで細胞を遠心分離により除去し、ついで得られた遊離の量を 1/2 に減らし、メタノールを添加して知えてグリコロールを析出した。

#### 実施例 2

##### ラセミ体 α-アラニンの製造

R312 菌株を、炭素源としてグルコースを含む培地で培養した。成長後、細胞を遠心分離し、Physiologic Water で水洗してから、塩化 α-アミノプロピオニトリルの 5 重量百分濃度で調製した反応培地に懸濁させた。pH を 8 に調整し、2 時間この値に保持した。と当たり 20~40g の乾燥物であるバクテリア細胞がかく抑下 25℃で 2~3 時間で培養の完全な加水分解を實現した。

たとえば、酢酸化剤に、ニチルエまたはその他の適切な有機溶剤でもって定量的収率で遊離抽出が可能である。この乳酸は食品工業で利用される一方、化学または製品工業で利用される。

#### 実施例 3

##### 乳酸の 1 の方法の改良

この方法においては、シアン酸の水溶液とアセトアルデヒドの水溶液を前と同じ濃度でモル比モルで反応させることにより、乳酸でラクチドニトリルを合成した。培養の pH は、反応進行のため脱脂アンモニアを加えて 5 の付添に調整した。ついで第 2 工程として、培養の pH をアンモニアにより 8 に調整し、バクテリア細胞を、と当たり乾燥重量 20~40g の割合で培地に懸濁させ、同記実施例と同様、2~3 時間で加水分解を實現した。

#### 実施例 4

##### グリコロールの製造

同記実施例と同じく、R312 菌株を、炭素源としてグルコースを含む培地で培養した。成長後、細胞を遠心分離し、Physiologic Water で水洗

し、遠心分離による細胞の除去後、培養液はと当たり約 40g の α-アラニンを含み、これを既知の方法で回収した。

#### 実施例 5

##### β-アラニンの製造

R312 菌株を前と同様に培養し回収した。アミノ-3-プロピオニトリルの 5 重量百分濃度により調製した反応培地にこれを懸濁させ、pH を 8 に調整し、30 分間この値に保持した。ついで pH を 7 にし、かく抑下 25℃で 5 時間この値に保持した。と当たり 60~80g の乾燥物であるバクテリア細胞がこれらの条件の下で完全な加水分解を實現した。遠心分離による細胞の除去後、培養液はと当たり 60g の β-アラニンを含み、これを既知の方法で回収した。

#### 実施例 6

##### ラセミ体メチオニンの製造

R312 菌株を前と同様に培養し回収した。水中で 6 重量百分の α-アミノ-ノニルオプロピオニトリルの濃度で調製した反応培地に懸濁させ

させ、20分後に開封した。とりより20分間の  
延焼物であるバクテリア細胞はかく得られ23℃で  
3時間ほど水浴を施した。遠心分離による細胞  
沈降させ、細胞の量を1/3に減らし0.1%にした。  
メチオニンが析出された。収量は80%であった。

#### 実験例7

実験例2と同様式、直接測定割合 (Proportions  
stoichiométrique) のメチルメチルアトロビ  
オンアロパヒド、アノメチア、アノメチアアノ化  
物からメチルアノメチアアノメチアアノメチア  
ルを収得せしめることができた。反応が完了し  
たとき、バクテリアを凍結させ、実験例6と同様  
に凍結した。

シアン化物の有毒性を考慮して、反応平衡につ  
いて若干調整する必要がある。

加水分解されたメチルメチルアノメチアアノ  
メチルメチア、一方で、調整した反応はすべての  
場合ニトリルをわけて好適であり、また便方  
は、加水分解反応により平衡が崩れ、溶液中に存  
在するシアン化物が消費し完全に利用される。

特開 昭49-3586 (5)

ただし、あらゆる事故を防止するため生産中  
のシアン化物の濃度コントロールを絶えず監視  
化する必要がある。当然に付する正視監視割合不  
はは常に可能である。1。

以上により、この反応は機やか条件で簡単  
に反応地地より多数のメチルメチアを加水分解し、  
もわめて純粋な化合物を低経費的に収束をもつて  
得ることを可能にする。

特許出願人 アジヤンス・ナショナル・ド・  
パロイザン・ド・ラ・  
カシエリヤ

代理人 秋 元 周

向 秋 元 不二

#### 6. 補正以外の発明者および代理人

##### 発 明 者

住 所 フランス国タレルン・レロー 84800  
リニエ・ナショナル  
氏 名 ブラン・アルノ  
住 所 フランス国モンペリエ 84000  
アベニュー・デ・ムラン、レ・ムラン(普通地)  
氏 名 ビエール・ブルジョ  
住 所 フランス国モンペリエ 84000  
クロ・デ・マイン、ブロンタ・アー(普通地)  
氏 名 ジヤン・クロード・ジャラヴィア

##### (外) 代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目4番2号  
氏 名 (1615) 外理士 秋 元 不二

#### 手 続 補 正 書

昭和 49 年 10 月 25 日

特許庁長官 殿

(特許庁審査官 殿)

##### 1. 事件の表示

昭和 49 年 特 許 願 第 108282 号

##### 2. 発明の名称

生物学的加水分解による有機炭素の製造法

##### 3. 補正をする者

事件との関係

特許出願人

氏 名 (800)

アジヤンス・ナショナル・ド・パロイザン・  
ド・ラ・カシエリヤ

##### 4. 代理人

住 所

東京都千代田区丸の内3丁目4番2号

氏 名

電話 (211) 4501~3番

氏 名

(6228) 弁理士 秋 元 周

氏 名

(1616) 弁理士 秋 元 不二

##### 5. 補正命令の日付 (日)

補正の日

昭和 49 年 10 月 25 日

##### 6. 補正の対象

明細書本文

##### 7. 補正の内容

特許のとり方

内容に記述なし

特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
昭和49年特許願第108288号(特開昭  
50-53586号 昭和50年5月12日  
発行公開特許公報50-5356号掲載)につ  
いては特許法第17条の2の規定による補正があっ  
たので下記のとおり掲載する。

| Int. Cl.  | 特許<br>記号 | 序内整理番号  |
|-----------|----------|---------|
| C12P 7/56 |          | 6760 4B |
| 13/06     |          | 6712 4B |
| 13/12     |          | 6712 4B |
| C12R 1/07 |          |         |
| 1/265     |          |         |
| 1/13      |          |         |

## 手続補正書

昭和56年7月30日

特許庁長官 殿

(特許庁審査官

殿)

### 1. 事件の表示

昭和49年特許願第108288号

### 2. 発明の名称

生物学的加水分解による有機酸の製造法

### 3. 補正をする者

事件との関係 出願人

氏名(名称) アソヤノ・ナショナル・ド・パロイザン・  
ド・ラ・ルンニエル

### 4. 代理人

住 所 東京都港区南青山一丁目1番1号

〒107 電話 475-1501(代)

氏 名 (6222) 弁護士 秋 元 輝 雄

住 所 同 所

氏 名 (1615) 弁護士 秋 元 不二三

### 5. 補正命令の日付(発見)

(発見日) 昭和 年 月 日

### 6. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲

### 7. 補正の内容

別紙のとおり

### 特許請求の範囲

水相液状のトリルをニトリル活性を有するバ  
クテリアと反応させることを特徴とする、対応す  
るニトリルの加水分解による有機酸の製造法。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**